

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-027979

(43)Date of publication of application : 29.01.2002

(51)Int.Cl.

C12N 9/99
A23L 1/30
A61K 35/70
A61K 35/78
A61P 3/04
A61P 3/10
A61P 43/00
//(C12N 9/99
C12R 1:66)

(21)Application number : 2000-214168

(71)Applicant : NIPPON SYNTHETIC CHEM IND CO
LTD:THE
NIPPON SUPPLEMENT KK

(22)Date of filing : 14.07.2000

(72)Inventor : FUJITA HIROYUKI

(54) METHOD FOR PRODUCING ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing an α -glucosidase inhibitor which can easily be taken out, does not have a smell and exhibits a strong inhibiting activity.

SOLUTION: This method for producing an α -glucosidase inhibitor is characterized by subjecting steamed or boiled beans belonging to the genus Vigna to a solid culture using a mold under a condition having a salt content of ≤ 5 wt.% and then extracting the culture product with $\geq 50^\circ$ C water.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-27979
(P2002-27979A)

(43) 公開日 平成14年1月29日 (2002.1.29)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 9/99		C 1 2 N 9/99	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 8 7
			B 4 C 0 8 8
A 6 1 K 35/70		A 6 1 K 35/70	
35/78		35/78	J
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-214168 (P2000-214168)

(22) 出願日 平成12年7月14日 (2000.7.14)

(71) 出願人 000004101
日本合成化学工業株式会社
大阪府大阪市北区大淀中一丁目1番88号
梅田スカイビル タワーイースト
(71) 出願人 500333132
日本サプリメント株式会社
大阪府大阪市北区大淀中1丁目1番88号
(72) 発明者 藤田 裕之
大阪府大阪市北区大淀中1丁目1番88号
日本サプリメント株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α -グルコシダーゼ阻害剤の製造法

(57) 【要約】

【課題】 摂取しやすく、臭いもなく強い阻害活性を示す α -グルコシダーゼ阻害剤の製造法を提供すること。

【解決手段】 蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆を、培養系の塩分を5重量%以下の条件でかびを用いて固形培養して得られた培養物から目的物を50℃以上の水で抽出する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆を、培養系の塩分を5重量%以下の条件下で、かびを用いて固形培養し、得られた培養物から50℃以上の水で抽出することを特徴とする α -グルコシダーゼ阻害剤の製造法。

【請求項2】 かびが、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属であることを特徴とする請求項1記載の α -グルコシダーゼ阻害剤の製造法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、医薬品、食品、健康食品などに使用することができる阻害活性が強く、臭いがなく、摂取し易い α -グルコシダーゼ阻害剤の製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 α -グルコシダーゼ阻害剤は、小腸の微絨毛に局在する α -グルコシダーゼを阻害し、食後の血糖値の急上昇及びそれに続くインスリン値の上昇を抑制することが、*Diabete Medicine*, 10, 688 (1993) に報告され、人間及び人間以外の動物においても炭水化物（特に、澱粉由来のオリゴ糖、シュクロース等）の代謝を抑制するために、例えば血糖上昇抑制作用を示し、過血糖症状及び過血糖に由来する肥満症、糖尿病などの種々の疾患の改善に有用である。また、 α -グルコシダーゼ阻害剤を添加して製造した食品は、代謝異常の患者食に適しており、さらに代謝異常予防食として健康な人にも適している。

【0003】 食品に由来する α -グルコシダーゼ阻害剤としては、例えば特開平9-65836号公報には、動物性蛋白質又は植物性蛋白質の酵素加水分解物が開示され、特開平5-17364号公報には茶ポリフェノールが開示されている。

【0004】 しかしながら、上記特開平9-65836号公報に記載の α -グルコシダーゼ阻害剤は、活性を示すためには食品として大量に摂取しなくてはならず、また、特開平5-17364号公報開示技術では、ポリフェノールの精製が煩雑であり、かつ通常摂取する茶ではやはり多量に摂取する必要がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 そこで本発明者は食品からかかる阻害剤を見いだすべく鋭意検討を行った結果、ササゲ属豆を固定培養した培養物に強い阻害活性があることを見出したが、通常、固定培養物は高塩分下で培養が実施されるため、食品、特に健康食品として日常摂取するには不適當であることが判明した。そこで塩分を抑えてササゲ属豆の固形培養を行ってみた所、細菌や酵母が繁殖するためか、培養物から臭いが発生してしまうという問題点が発生した。

【0006】

【課題を解決するための手段】 かかる問題点について鋭意研究した結果、蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆を、培養系の塩分を少量に抑えた5重量%以下という条件でかびを用いて固形培養して得られる培養物であっても、それを50℃以上の水で抽出することによって阻害剤の臭いを消失させることができ、しかも阻害活性を更に向上させ得ることを見だし本発明を完成した。

【0007】

【発明の実施の形態】 以下本発明について具体的に説明する。本発明に用いられるササゲ属豆としては、アズキ（別名ショウズ）、ササゲ（別名ナガササゲ、ハタササゲ）、リュクトウ（別名ヤエナリ、アオアズキ）、タケアズキ（別名ツルアズキ、バカアズキ）等が挙げられ、かかるササゲ属豆を加工した、粉体、穀粒等いずれも用いられる。本発明の製造法を実施するに当っては、まず上記のササゲ属豆を水に浸漬した後、蒸煮あるいは煮沸するのであるが、かかる浸漬の条件としては、ササゲ属豆を10～30℃の水に1～18時間漬ける。また、蒸煮あるいは煮沸の条件としては、ササゲ属豆を蒸煮器に入れて、蓋をして下から水蒸気を送って蒸煮前（浸漬後）のササゲ属豆に比べて重量が1.02～2倍となるまで0.2～2時間程度蒸煮したり、沸騰水に入れて30～360分間煮沸する。

【0008】 ササゲ属豆はもともと自然界で0.1重量%以下の塩分を含有し、蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆では0.01重量%以下の塩分を含有するので、そのまま次のかびつけ工程に入ってもよいが、固形培養の安定性をはかるため、かかる系の塩分が5重量%以下（好ましくは1重量%以下）になる範囲で塩分を添加してもよい。かかる塩分が5重量%を越えると後で抽出操作を行っても塩分が抽出物中に混入し、摂取時に著しく塩辛くあるいはまずくなるので阻害剤の脱塩処理を施す必要があり不適當である。

【0009】 培養系の塩分は、培養物にイオン交換水を加えて攪拌し、その上澄みを適宜希釈してデジタル塩分計（積水化学工業社製『SS-31A』）を使用して測定して求める。添加する塩分としては塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウム等が挙げられる。

【0010】 次いで、蒸煮あるいは煮沸の後固形培養を行うのであるが、まずかび付けから実施する。かかるかびとしては醤油、もろみ、トウチ、みそ等の製造に用いられるもので、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属のかびが好ましく、例えば、アスペルギルス アルバス (*Aspergillus albus* IFO4039)、アスペルギルス キャンディダス (*Aspergillus candidus* IFO4389)、アスペルギルス ニーズランス (*Aspergillus nidulans* ATCC10074)、アスペルギルス グラウカス (*Aspergillus glaucus* ATCC10059)、アスペルギル

ス オリゼー (*Aspergillus oryzae* IFO4135)、アスペルギルス フラバス (*Aspergillus flavus* IFO5839)、アスペルギルス インディカス (*Aspergillus indicus* ATCC15054)、アスペルギルス スルフレウス (*Aspergillus sulphureus* ATCC11904)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger* IFO4343)、アスペルギルス ソジャエ (*Aspergillus sojae* IFO4200)、アスペルギルス タマリ (*Aspergillus tamaris* ATCC12669) 等が挙げられる。具体的には、『ハイ・ソーヤ』、『マイルド・S』、『スリーダイヤ』、『ダイヤモンドC』、『うすむらさき』、『宝菌』、『白醤油用菌』、『改良焼酎用菌』(以上いずれも株式会社樋口松之助商店製)等の市販品が挙げられる。かび付けする場合のかびの添加量は特に制限されないが、ササゲ属豆に対して0.0001~10重量%程度である。かび付けの方法としては蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆にかびを振りかけたり、一度培養した容器や発酵室に残存しているかびと該ササゲ属豆を接触させる等の方法が挙げられる。

【0011】かび付け後固形培養を開始する。固形培養温度は10~50℃程度(好ましくは25~45℃)、湿度80~100%RH(好ましくは90~100%RH)で、12~120時間(好ましくは48~96時間)実施される。更に必要に応じて得られた培養物を5~40℃で、2~120日程度放置して熟成工程を行ってもよい。発酵終了後、必要に応じてササゲ属豆表面に付着しているかびを落す為に水洗する。

【0012】次にかかる培養物を50℃以上の水で抽出するのであるが、好ましくは60℃以上の水で抽出する。水の温度が50℃未満では、阻害活性の向上が見られず、更に培養物中に発生する臭い成分の除去ができず不適当である。

【0013】上記の50℃以上の水で抽出するには、培養物に1~30倍重量(好ましくは2~15倍重量)の水を加え、昇温すればよい。抽出時間は90℃までの抽出温度では5~20時間、90℃を越えると1~10時間程度でよい。また、必要であればオートクレーブ等を利用して100℃以上で0.2~5時間抽出することができる。抽出法としては、特に制限はないが、通常攪拌抽出あるいは浸漬抽出が用いられる。得られた抽出液は清澄濾過、遠心分離、膜分離等により固形分を去除した後、必要に応じて活性炭や白土で脱色してから、濃縮乾燥、フリーズドライ、スプレードライ等の方法で粉末化するのが好ましい。

【0014】かくして得られた α -グルコシダーゼ阻害剤は、血糖上昇抑制作用を有しているため、水、エタノール、エチレングリコール、ポリエチレングリコールな

どの液状担体や、でんぷん、セルロースなどの固形担体などの無毒性担体で希釈して、アンプル剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、シロップ剤などの医薬品、健康食品として代謝異常の患者食又は予防薬、糖尿病の予防薬、あるいは抗肥満食、ダイエット食として用いることができる。さらに、本発明の α -グルコシダーゼ阻害剤を含有する上記製剤を、食前、食中、食後、食間などに服用することにより、喫食による血糖濃度の増加を抑制することができる。

【0015】摂取量としては、乾燥粉末として、0.001~10g/日が好ましく、特に0.01~3g/日が好ましい。

【0016】本発明の製造法で得られた α -グルコシダーゼ阻害剤は、塩分が少なく、臭いがないので、例えば、以下のような食品に添加可能である。

(1) 農水産加工品

はるさめ、こしあん、こんにやく、パン、麺類(即席めん、パスタ、生めん、乾めん)、餅、シリアル食品、大豆加工品(豆腐、豆乳、納豆、凍豆腐)、水産加工品〔練り製品、(かに風味)蒲鉾、(魚肉)ハム、(魚肉)ソーセージ、(魚肉)ウィンナー、ふりかけ、お茶づけのり〕、卵含有食品(スープ、丼等)、缶詰(シーチキン、オイルサーディン、焼鳥)、レトルト食品(カレー、シチュー、スパゲティー)、みそ汁、スープ

(2) 乳製品

牛乳、加工乳、乳酸菌飲料、バター、チーズ、練乳、粉乳

(3) 調味料

味噌、醤油、うま味(風味)調味料、(粉末)天然調味料、ソース、ドレッシング、焼き肉のたれ、みりん、カレー、シチュー、香辛料、スパイス、ヨーグルト

【0017】(4) 健康食品(栄養補助食品)

①サポニン含有食品(オタネニンジン根含有食品、エゾウコギ含有食品)

②糖含有食品〔オリゴ糖(フラクトオリゴ糖含有食品、イソマルトオリゴ糖含有食品、ガラクトオリゴ糖含有食品)、多糖類(シイタケ含有食品、ムコ多糖、蛋白含有食品、コンドロイチン硫酸含有食品、マンネンタケ(靈芝)含有食品、キチン、キトサン含有食品)〕

③ミネラル含有食品(カルシウム含有食品、アルファルファ含有食品、ブルーネエキス食品、 β -カロチン含有食品)

④油脂含有食品

ビタミンE含有油脂〔麦(小麦、鳩麦)胚芽油、大豆胚芽油、米胚芽油〕、エイコサペンタエン酸含有食品、大豆レシチン含有食品、 γ -リノレン酸含有食品(月見草油、ボラージ油)、ドコサヘキサエン酸含有食品

⑤蛋白質含有食品

大豆蛋白含有食品、カゼイン、ホエイ蛋白、鰹加工食品

⑥タウリン

かき加工食品、シジミ加工食品、緑イ貝加工食品

【0018】(5)その他

スッポン加工食品、アミノ酸代謝異常用食品、流動食(病食)

また、下記のような、糖を多量に含有する食品にも添加可能であるが、本発明の効果が明確に発現しない場合もあり、下記のような食品に添加する場合は、食品の製造時に糖含有量をできるだけ低くしたり、人工甘味量を用いて低糖分としたものに添加するのが好ましい。

(6)菓子

ケーキ、ムース、(粉末)デザート、アイスクリーム、飴、チョコレート、グミ、キャンディー、クッキー、ウエハース、ゼリー

(7)飲料

清涼飲料(炭酸飲料、果実飲料、スポーツドリンク、栄養飲料)、嗜好飲料(コーヒー、ココア、麦汁)

【0019】上記(1)～(7)における添加量としては、上記食品に対して、乾燥粉末として、0.01～80重量%が好ましく、特に1～70重量%が好ましい。更に本発明の効果を阻害しない範囲で、甘味剤、保存剤、分散剤、着色剤、酸化防止剤等も併用することができる。更に、その他の公知の α -グルコシダーゼ阻害剤であるパリエナミンやアミノシクリトールなどを併用してもよい。

【0020】

【実施例】以下本発明について例を挙げて具体的に説明する。尚、以下の記述で「%」とあるのは、特に断りのない限り重量%である。

実施例1

アズキ1000gを25℃の水10リットルに3時間浸漬して重量を1100gにした後、蒸煮器に入れて100℃で1時間蒸煮して2000gの蒸煮したアズキ[塩分含有量は検出限界(0.01%)以下]を得た。かかる蒸煮したアズキを発酵室の竹かごの上に並べて市販の醤油製造用のかび(株式会社樋口松之助商店製『マイルド・S』)10gを均一にふりかけて添加して、35℃、湿度100%RHで96時間固形培養した。培養終了後培養物表面のかびを水洗し、80℃で24時間風乾して培養物800gを得た。該培養物を4リットルの水に1時間浸漬後、該浸漬液をオートクレープに入れて、内温125℃で1時間抽出した。得られた抽出液からざるを用いて大きな残渣を除去した。得られた濾液と、該残渣に再度4リットルの水を加えてざるで濾過して得られた濾液とを合わせて、遠心分離(条件1000×g)した。得られた上澄み液に活性炭100gを加えて攪拌して脱色し、濾過して抽出液4リットルを得た。その後ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤240gを得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを以下のように評価した。

【0021】(阻害活性)

・ラット小腸からの(三)糖加水分解酵素(α -グルコシダーゼ)の調製

冷凍保存しておいたラット小腸(空腸)を解凍し、粘膜をピンセットで押出すように採取した。該粘膜に5倍重量の5mMエチレンジアミン四酢酸を含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を加え、冷却しながらホモゲナイズした。その後遠心分離(4℃、21000×g、60分)し、得られた沈殿物に5倍重量になるように1%トリトンX-100を含む0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を加え、可溶化処理(4℃、60分)を行った。これを超遠心分離(4℃、110000×g、90分)し、この上清を0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で透析(4℃、24時間)し、酵素液とした。

【0022】・酵素(α -グルコシダーゼ)活性の測定
酵素活性は市販のキットを用い、基質としてはシュクロースを用いた。標準反応液組成は、60mM基質溶液(シュクロースを0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH6.3に溶解したもの)0.7ml、被験物質溶液(それぞれの分画成分の水、有機溶剤を完全に除去した後、50%ジメチルスルホキシド水溶液に溶解)0.2ml、上記酵素液0.1ml(計1.0ml)とした。これを37℃、15分間反応させ、2Mトリス塩酸緩衝液(pH7.0)1.5mlを用いて反応を停止させ試験液とした。次に96穴マイクロプレートに1穴あたり発色試薬[グルコースBテストワコー(和光純薬製)]200 μ lに試験液50 μ l(酢酸エチル等は留去したもの)を加え、37℃で30分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー(BIO-RAD社製、MODEL550)で490nmの吸光度を測定した。基質溶液の代りに0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH6.3)を加えた時の吸光度をブランク値とし、この値を差し引いた値をA490sとした。被験液の代りに50重量%ジメチルスルホキシド水溶液を加えた時の吸光度をコントロール値(A490c)とし、下式により α -グルコシダーゼ阻害活性を求めた。測定は2回行い、平均値を測定値とした。

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ阻害活性}(\%) = [(A490c - A490s) / A490c] \times 100$$

【0023】(臭い)

得られた阻害剤の臭いを以下のように評価した。

○・・・全く無臭である。

△・・・かすかに臭いがする。

×・・・強い臭いがする。

【0024】(摂取し易さ)

○・・・塩辛くなく、ササゲ属豆のうまみが出て摂取し易い。

×・・・塩辛いあるいはササゲ属豆特有の臭いが強くて1g以上摂取するのは苦痛である。

【0025】実施例2

実施例 1 の終了後、実施例 1 と同じ発酵室において、かび（株式会社樋口松之助商店製『マイルド・S』）の替りに、実施例 1 で用いた竹かごに付着していた培養物中のかびで、同例と同じ煮沸したアズキを 35℃、湿度 100%RH で 72 時間かびを固形培養し、培養終了後培養物表面のかびを水洗し、80℃で 24 時間風乾して培養物 780g を得た。該培養物を 4 リットルの水に 1 時間浸漬後、該浸漬液をオートクレーブに入れて、125℃で 1 時間抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 4 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤 234g を得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0026】実施例 3

実施例 1 において固形培養の温度を 37℃にした以外は同様に培養し培養物 745g を得た。かかる培養物を陶器の器に入れて、蓋をして 35℃で 40 日間後発酵させて培養物 740g を得た。該培養物を 4 リットルの水に 1 時間浸漬後、該浸漬液をオートクレーブに入れて、125℃で 1 時間抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 3.8 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤 220g を得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0027】実施例 4

実施例 1 におけるオートクレーブに代えて、鍋を用いて抽出温度を 60℃にして抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 3 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤 153g を得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0028】実施例 5

実施例 1 においてアズキに替えてタケアズキを用いた以外は同様に固形培養して培養物 730g を得た。該培養

物を 3 リットルの水に 1 時間浸漬後、該浸漬液をオートクレーブに入れて、125℃で 1 時間抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 3.5 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤 220g を得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0029】実施例 6

実施例 1 においてアズキに替えてリョクトウを用いた以外は同様に固形培養して培養物 715g を得た。該培養物を 3 リットルの水に 1 時間浸漬後、該浸漬液をオートクレーブに入れて、125℃で 1 時間抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 3.2 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して阻害剤 193g を得た。かかる阻害剤の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0030】比較例 1

アズキ 1000g を水 10 リットルに 3 時間浸漬した後、蒸煮器に入れて 100℃で 1 時間蒸煮して 2000g の蒸煮したアズキ（塩分 0.01% 以下）を得た。かかる蒸し米に塩を 200g 添加（塩分 10%）してから実施例 1 と同様に発酵させて培養物 900g を得た。該培養物を実施例 1 と同様に抽出し、同様に処理して抽出液 4.1 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して固形物 320g を得た。かかる固形物の阻害活性、臭い、摂取の容易さを実施例 1 と同様に評価した。

【0031】比較例 2

実施例 1 で得られた培養物 800g を 4 リットルの水に 1 時間浸漬後、40℃で 1 時間抽出した。その後実施例 1 と同様に処理して抽出液 3.7 リットルを得、ロータリーエバポレータで濃縮乾固して固形物 80g を得た。かかる固形物の阻害活性、臭い、摂取の容易さを同じく評価した。

【0032】

〔表 1〕

	α -グルコシダーゼ 阻害活性 (%) *	臭い	摂取のし易さ
実施例 1	90	○	○
実施例 2	91	○	○
実施例 3	91	○	○
実施例 4	90	○	○
実施例 5	92	○	○
実施例 6	92	○	○
比較例 1	88	×	×
比較例 2	10	△	×

* 被験物の反応系での濃度 10mg/ml

【0033】

【発明の効果】本発明では、蒸煮あるいは煮沸したササゲ属豆を、培養系の塩分が 5 重量% 以下となる条件でかびで固形培養して得られた培養物から 50℃以上の水で

α -グルコシダーゼ阻害剤を抽出することにより、摂取し易く、臭いもなく、強い阻害活性を示す α -グルコシダーゼ阻害剤が製造できる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ターム (参考)
A 6 1 P 3/04		A 6 1 P 3/04	
3/10		3/10	
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
//(C 1 2 N 9/99		(C 1 2 N 9/99	
C 1 2 R 1:66)		C 1 2 R 1:66)	

Fターム (参考) 4B018 LB01 LB02 LB04 LB05 LB06
 LB07 LB08 LB09 MD57 ME03
 MF13
 4C087 AA01 AA02 BC06 CA10 CA11
 MA01 NA14 ZA70 ZC20 ZC35
 4C088 AB59 AC04 AD16 BA09 CA25
 MA07 NA14 ZA70 ZC20 ZC35